



Espacenet

Bibliographic data: WO 0231131 (A1)

NOVEL PLA1

Publication date:	2002-04-18
Inventor(s):	ARAI HIROYUKI [JP]; AOKI JUNKEN [JP] +
Applicant(s):	MOCHIDA PHARM CO LTD [JP]; ARAI HIROYUKI [JP]; AOKI JUNKEN [JP] +
Classification:	<p>International: A61P43/00; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/55; C12N9/20; A61K38/00; (IPC1-7): A61K31/711; A61K38/46; A61K39/395; A61P43/00; C07K16/40; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/55; C12N5/10; C12N9/16; C12Q1/02; C12Q1/68</p> <p>- European: C12N9/20</p>
Application number:	WO2001JP07108 20010820
Priority number(s):	JP20000311015 20001011
Also published as:	<ul style="list-style-type: none"> EP 1329501 (A1) US 2004253221 (A1) CA 2425845 (A1) AU 7877301 (A)
Cited documents:	WO9957132 (A1) JP10201479 (A) WO0024911 (A2) WO0132885 (A2) View all

Abstract of WO 0231131 (A1)

A novel phospholipase A1 (PLA1) having a substrate specificity for phosphatidic acid (PA); a peptide or a polypeptide originating in the novel PLA1; a polynucleotide encoding the peptide or the polypeptide originating in the novel PLA1; a process for producing the peptide or the polypeptide originating in the novel PLA1; an antibody against the peptide or the polypeptide originating in the novel PLA1; a method of identifying an inhibitor, an antagonist or a potentiator for the novel PLA1 by using the same; a compound identified by this method; and medicinal compositions and a diagnostic method with the use of the same.

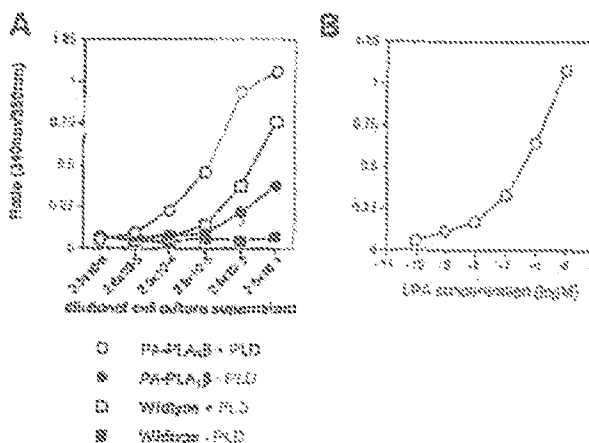


図1

A. PA-PLA1発現細胞におけるLPAの産生。

PA-PLA1発現細胞は、WildtypeのPA-PLA1とPLDを用いて培養し、30分間の培養後、この培養液中のLPAを次のように測定する。LPA発現細胞(10⁶)を培養させた30分間、この培養液中を培養液をとり出し、LPAの濃度を測定する。B. LPA1発現細胞におけるLPAの産生。

図1. ILLUSTRATION OF THE GRAPH

A. PA-PLA1 PRODUCTION OF LPA BY CELLS EXPRESSING PA-PLA1. IMPACT CELLS WERE INFECTED WITH PA-PLA1 OF A WILDTYPE BACULOVIRUS. AFTER 30 MINUTES, THE CULTURE SUPERNATANT IS COLLECTED. LPA IN THIS CULTURE SUPERNATANT IS ASSAYED BY THE FOLLOWING METHOD. THE 10⁶ CELLS EXPRESSING LPA RECEPTOR BODY IS TREATED WITH SERIAL DILUTIONS OF THIS CULTURE SUPERNATANT AND THE CALCULATED IN THE CELLS IS QUANTIFIED.

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 4 月 18 日 (18.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/31131 A1(51) 国際特許分類: C12N 9/16, 15/55, 1/21,
1/19, 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/02, 1/68, A61K 31/711,
38/46, 39/395, A61P 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/07106

(22) 国際出願日: 2001 年 8 月 20 日 (20.08.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2000-311015
2000 年 10 月 11 日 (11.10.2000) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 持田製
薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒160-8515 東京都新宿区四谷一丁目 7
番地 Tokyo (JP).

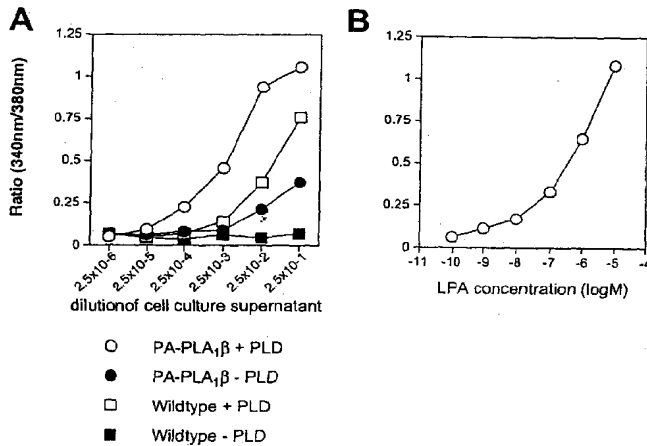
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 新井洋由 (ARAI,
Hiroyuki) [JP/JP]; 〒112-0002 東京都文京区小石川五
丁目 35 番 8 号 クレアホームズ 604 号 Tokyo (JP). 青木
淳賢 (AOKI, Junken) [JP/JP]; 〒154-0003 東京都世田
谷区野沢一丁目 35 番 3 号 ハウスソラーナ 413 号 Tokyo
(JP).(74) 代理人: 阿部正博 (ABE, Masahiro); 〒274-0825 千葉
県船橋市前原西二丁目 14 番 1 号 ダイアパレス津田沼
1001 号 Chiba (JP).

[続葉有]

(54) Title: NOVEL PLA1

(54) 発明の名称: 新規 PLA1



図の説明 a

A. PA-PLA₁β 発現細胞における LPA の産生。
PA-PLA₁β あるいは、Wildtype のバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞 Sf9 を放線
菌由来のホスホリパーゼ D で刺激し、30 分後の培養上清を回収する。この培養上清中
の LPA を次のように測定する。LPA 受容体 EDG7 を発現させた Sf9 細胞に、この培養上
清を希釈系列を作り作用させ、細胞内カルシウムを測定する。b

B. EDG7 発現細胞における 1-oleoyl-LPA の温度作用曲線を示す。 c

a... ILLUSTRATION OF THE DRAWINGS

b... A: PRODUCTION OF LPA BY CELLS EXPRESSING PA-PLA₁β.
INSECT CELLS Sf9 INFECTED WITH PA-PLA₁β OR A WILDTYPE
BACULOVIRUS ARE STIMULATED WITH PHOSPHOLIPASE D ORIGINATING
IN ACTINOMYCETES AND, AFTER 30 MINUTES, THE CULTURE
SUPERNATANT IS COLLECTED. LPA IN THIS CULTURE SUPERNATANT
IS ASSAYED BY THE FOLLOWING METHOD. THE Sf9 CELLS EXPRESSING
LPA RECEPTOR EDG7 IS TREATED WITH SERIAL DILUTIONS OF
THIS CULTURE SUPERNATANT AND THUS CALCIUM IN THE CELLS IS
QUANTIFIED.

c... B: 1-OLEOYL-LPA CONCENTRATION TREATMENT CURVE ON CELLS
EXPRESSING EDG7

(57) Abstract: A novel phospholipase A₁ (PLA₁) hav-
ing a substrate specificity for phosphatidic acid (PA); a
peptide or a polypeptide originating in the novel PLA₁; a
polynucleotide encoding the peptide or the polypeptide
originating in the novel PLA₁; a process for producing
the peptide or the polypeptide originating in the novel
PLA₁; an antibody against the peptide or the polypep-
tide originating in the novel PLA₁; a method of identi-
fying an inhibitor, an antagonist or a potentiator for the
novel PLA₁ by using the same; a compound identified by
this method; and medicinal compositions and a diagnos-
tic method with the use of the same.

[続葉有]



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AI, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、ホスファチジン酸 (PA) に対する基質特異性を有する新規なホスホリパーゼ A₁ (PLA₁) および該新規 PLA₁ 由来のペプチドまたはポリペプチド、新規 PLA₁ 由来のペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、新規 PLA₁ 由来のペプチドまたはポリペプチドの製造法、新規 PLA₁ 由来のペプチドまたはポリペプチドに対する抗体、およびこれらを利用して新規 PLA₁ の阻害剤、拮抗剤、賦活剤の同定を行なう方法、さらにこの方法で同定された化合物を提供することであり、またこれらを利用した医薬組成物および診断方法を提供する。

明 細 書

新規 P L A₁

技術分野

本発明は、新規なリパーゼ、特にホスホリパーゼ A₁ (p h o s p h o l i p a s e A₁; 以下 P L A₁と呼ぶこともある) に関するものである。さらに詳しくは、新規 P L A₁ のアミノ酸配列の全部または一部を有するペプチドまたはポリペプチド、該ペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該形質転換体を使ったペプチドまたはポリペプチドの製造方法、該ペプチドまたはポリペプチドに対する抗体、これらを利用した化合物の同定方法、該同定された化合物、該ポリペプチドもしくは該ポリヌクレオチドに作用する活性阻害化合物または活性賦活化合物、これらに関する医薬組成物とその製造方法およびこの医薬組成物を用いた治療方法、並びにこれらに関する疾病診断方法に関する。

背景技術

P L A₁ は、グリセロリン脂質のグリセロール 1 位のエステル結合を加水分解する酵素である。これまでに様々な臓器でこの酵素活性の存在が検出されており、また基質特異性により区別されるいくつかの P L A₁ が報告されている。c D N A クローニングされているものとしては、蜂毒の P L A₁ (D o l m 1)、P S - P L A₁ [ホスファチジルセリン (P S) およびリゾホスファチジルセリン (l y s o P S) のグリセロ

ールの1位のエステル結合を特異的に加水分解する(特開平10-201479号)(蛋白質 核酸 酵素, 44, 1038-1042, 1999)、ヒト精巢のPA-PLA₁〔ホスファチジン酸(PA)のグリセロールの1位のエステル結合を特異的に加水分解する(J. Biol. Chem., 273, 5468-5477, 1998)〕等がある。また、リパーゼファミリーの分子は、しばしばトリアシルグリセロールを分解する活性以外に、PLA₁活性を併せ持つことが知られている(FEBS Letters, 320, 145-149, 1993)(Biochemistry, 32, 4702-4707, 1993)(J. Biol. Chem., 272, 2192-2198, 1997)。さらに、これまでに見つかったリパーゼファミリーに属するPLA₁は全て、短いリッド(Lid)(B. B. A., 1376, 417-432, 1998)(Biochemistry, 32, 4702-4707, 1993)を有するが、その生理的意義は必ずしも明らかになっていない。また、リパーゼ分子上の糖鎖がリパーゼ活性に関与する可能性が示唆されている(J. Lipid Res., 35, 1511-1523, 1994)(J. Lipid Res., 36, 939-951, 1995)。

PLA₁の機能の一つにリン脂質(phospholipid)を分解する作用があるが、生成物のひとつであるリゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid; 以下LPAと略称することもある)(B. B. A., 1198, 185-196, 1994)には多くの生理活性が知られており、生物学的有用性において着目されている〔細胞工学, 17, (5), 739-745, 1998〕。LPAの主要な作用としては、血圧の上昇作用(Lipids, 13, 572-574, 1978)、血小板凝集作用(Am. J. Pathol., 96, 4

23-438, 1979)、細胞増殖促進作用 (Cell, 59, 45-54, 1989) があり、またこれら以外にも、ガン細胞の浸潤促進、細胞接着、ストレスファイバーの形成、化学走性誘発、神経突起の退縮、アポトーシスの抑制、創傷治癒への関連等多様な作用が報告されている (B. B. A., 1198, 185-196, 1994)。

ホスファチジン酸 (phosphatidic acid; 以下、P A と略称することもある) に対して特異性を持つ P L A₁ としては、ヒト精巣 P A-P L A₁ が知られており、c D N A もクローニングされているが、該 P L A₁ は細胞内の酵素であり、リン脂質代謝の中心であるホスファチジン酸の s n-1 位の脂肪酸の代謝回転を決定する因子として捉えられている (J. Biol. Chem., 273, 5468-5477, 1998)。また、ヒト精巣 P A-P L A₁ は反応条件によっては、ホスファチジルエタノールアミン (P E)、ホスファチジルイノシトール (P I) も加水分解することが報告されている。

本発明は、上記のように多様な、ある局面においてはむしろ悪益な作用の原因物質となり得る L P A の産生触媒たる P L A₁ に関する新規な物質を見だし、生体内における L P A の制御を可能にすることを目的のひとつとするものである。

発明の開示

本発明は、(1) 下記の群より選ばれるポリペプチド;

①配列表の配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド、

②前記①のポリペプチドを含有するポリペプチド、

③前記①のポリペプチドと少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有しかつホスファチジン酸を分解する活性を有するポリペプチド、および

④前記アミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつホスファチジン酸を分解する活性を有するポリペプチド、(2)配列表の配列番号1または2に記載のアミノ酸配列の少なくとも約8個の連続するアミノ酸配列を有するペプチド、(3)前記1または2のポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、(4)前記3のポリヌクレオチドまたはその相補鎖と選択的な条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド、(5)配列表の配列番号3または4に記載の塩基配列またはその相補的配列の少なくとも約15個の連続する塩基配列で示されるポリヌクレオチド、(6)前記3ないし5の何れかのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、(7)前記6の組換えベクターで形質転換された形質転換体、(8)前記7の形質転換体を培養する工程を含む、前記1または2のポリペプチドまたはペプチドの製造方法、(9)前記1または2のポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体、(10)ホスファチジン酸を分解する活性を抑制する、前記9の抗体、(11)前記1のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、および／または前記3もしくは4のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、前記1または2のポリペプチドもしくはペプチド、前記3ないし5の何れかのポリヌクレオチド、前記6のベクター、前記7の形質転換体、前記9もしくは10の抗体のうち、少なくとも何れか一つを用いることを特徴とする方法、(12)前記1のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、または前記3もしくは4のポリヌクレオチ

ドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの間の相互作用を可能にする条件下で、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し（かかる相互作用はポリペプチドまたはポリヌクレオチドと化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第2の成分に関連したものである）、次いで、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用して、その活性を活性化または阻害するかどうかを決定することを含む方法、(13)前記1のポリペプチドまたは前記3もしくは4のポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を阻害もしくは活性化する化合物の同定方法であって、前記7の形質転換体と、該形質転換体中で発現される前記1のポリペプチドがホスファチジン酸に作用することにより生産されるリゾホスファチジン酸に対する受容体を発現させた別の形質転換体とを用い、化合物とこれら形質転換体の相互作用を可能にする条件下で、これら形質転換体とスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し（かかる作用は形質転換体と化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第2の成分に関連したものである）、次いで、化合物と形質転換体との相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を、活性化または阻害するかどうかを決定することを含む方法、(14)前記11ないし13の方法で同定される化合物、(15)前記1のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、または前記3もしくは4のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害

もしくは促進する化合物、(16)前記1または2のポリペプチドもしくはペプチド、前記3ないし5の何れかのポリヌクレオチド、前記6のベクター、前記7の形質転換体、前記9もしくは10の抗体、または前記14もしくは15の化合物のうち、少なくとも何れか一つを含有することを特徴とする医薬組成物、(17)個体における前記1のポリペプチドの発現または活性に関連した疾病の診断方法であって、(a)該ポリペプチドをコードしている核酸配列、および／または(b)個体由来の試料中の該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む方法、(18)前記16の医薬組成物をホスホリパーゼA₁に関連する疾患に用いることを特徴とする治療方法、(19)前記16の医薬組成物の製造方法、からなる。

図面の簡単な説明

図1は、新規PLA₁ (short-type) の配列およびその配列の特徴を説明する図である。図中、二重下線はシグナル配列、下線は糖鎖付加予測部位、両矢印の下線はリパーゼコンセンサス配列およびリッド領域、四角で囲んだS、D、Hは活性トライアドを示す。

図2は図1の続きであり、新規PLA₁ (short-type) の配列およびその配列の特徴を説明する図である。図中、二重下線はシグナル配列、下線は糖鎖付加予測部位、両矢印の下線はリパーゼコンセンサス配列およびリッド領域、四角で囲んだS、D、Hは活性トライアドを示す。

図3は、新規PLA₁の作用を検討するための、新規PLA₁発現細胞とFura2を取り込ませたLPA受容体EDG7発現細胞とを用いるバイオアッセイシステムを説明する図である。

図4(A)は、新規PLA₁を発現させたSf9が、LPA受容体E

D G 7を発現させたS f 9の細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させること、および新規P L A₁が媒介するL P A産生におけるP L Dの関与を示す図である。

図4（B）は、E D G 7発現細胞における1-o l e y l-L P Aの濃度作用曲線を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

（新規P L A₁）

本発明において提供される新規P L A₁は、c D N Aライブラリーから、新規なアミノ酸配列を有する物質としてそのc D N Aが取得されたものである。そして、本発明の新規P L A₁は、ヒトの精巢において、その存在がノザンブロットィング法によって確認された。本発明の新規P L A₁は以下のような性質を有する。リン脂質、特にホスファチジン酸（P A）に作用してL P Aを生成する。リパーゼファミリーに保存されるコンセンサス配列および触媒トライアドならびにリッドと考えられるアミノ酸を有する。また、既知P L A₁類との相同性は約40%未満である。

（ポリペプチドまたはペプチド）

本発明の新規P L A₁のアミノ酸配列は、配列表の配列番号1または2に記載のポリペプチドである。さらに本発明のポリペプチドまたはペプチドは、該配列表の配列番号1または2に記載のポリペプチドの少なくとも一部分を含有するポリペプチドまたはペプチドから選択される。その選択されるポリペプチドまたはペプチドは、配列表の配列番号1または2に記載のポリペプチドと、アミノ酸配列上で約40%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは

約 90%、特に好ましくは約 95%以上の相同性を有する。この相同性をもつポリペプチドまたはペプチドの選択は、リン脂質、特にホスファチジン酸を分解し得る活性および／またはホスファチジン酸に対する基質特異性の存在を指標にして可能である。上記分解活性は公知の方法、例えば、放射性同位体 (R I) 標識基質、蛍光基質、もしくは発色基質を用いた方法、または実施例に記載の方法で測定できる (J. Biochem., 103, 442-447, 1988) (J. Biochem., 117, 1280-1287, 1995) (J. Biochem., 101, 53-61, 1987) (J. Biol. Chem., 235, 2595-2599, 1960) (J. Biol. Chem., 272, 2192-2198, 1997)。

アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、cDNAの塩基配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等が挙げられる。

本発明のポリペプチドまたはペプチドは、配列表の配列番号 1 または 2 に記載のポリペプチドの部分配列を有するポリペプチドまたはペプチドを包含し、これらは例えば試薬、標準物質、または免疫原として利用できる。その最小単位としては 8 個以上のアミノ酸、好ましくは 10 個以上のアミノ酸、より好ましくは 12 個以上、さらに好ましくは 15 個以上の連続するアミノ酸で構成されるアミノ酸配列からなり、好ましくは免疫学的に同定し得るポリペプチドまたはペプチドを本発明の対象とする。これらのペプチドは、試薬もしくは標準物質、または後述するように新規 P L A₁ に特異的な抗体を作製するための抗原として単独またはキャリア (例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたは卵白ア

ルブミン等)と結合して使用できるが、これらのように別種の蛋白質または物質を結合したのも本発明の範囲に包含される。

さらに、このように特定されたポリペプチドまたはペプチドを基にして、リン脂質、特にホスファチジン酸を分解し得る活性および／またはホスファチジン酸に対する基質特異性の存在を指標とすることにより、1以上、例えば1～100個、好ましくは1～30個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個、特に好ましくは1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはペプチドも提供される。欠失、置換、付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖増幅法(PCR)を単独または適宜組み合わせ、例えばサムブルック等編[モレキュラークローニング, アラボラトリーマニュアル第2版]コールドスプリングハーバーラボラトリー, 1989、村松正實編[ラボマニュアル遺伝子工学]丸善株式会社, 1988、エールリッヒ, H E. 編[PCRテクノロジー, DNA増幅の原理と応用]ストックトンプレス, 1989等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばUlmerの技術(Science, 219, 666, 1983)を利用することができる。

上記のような変異の導入において、当該蛋白質の基本的な性質(物性、活性、または免疫学的活性等)を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸(極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等)の間での相互置換は容易に想定される。後述するように、リパー

ゼファミリーのコンセンサス配列およびリッド領域は活性の発現または調節に重要と考えられ、これらを含む領域、特に触媒トライアドを含むコンセンサス配列は一次配列上および／または立体構造上保持されていることがP L A₁活性、特にP A－P L A₁活性を維持するためには好ましい。また、本発明のポリペプチドまたはペプチドは、糖鎖の有無に拘わらず本発明の範囲に包含されるが、糖鎖が活性に影響する可能性もあるため、少なくとも1つのグリコシレーションサイトは保持されていることが好ましい。

本発明においては、配列表の配列番号1または2のアミノ酸配列で示されるポリペプチドと同様のP L A₁活性を有するポリペプチドまたはその最小活性単位（領域もしくはドメイン）も提供されるが、それら以外にも、活性の強度または基質特異性を変更したポリペプチドが提供される。これらは、例えばP L A₁活性様物質もしくはP L A₁拮抗物質として、またはP L A₁活性を調節する物質のスクリーニング等において有用である。なお、ヒト以外の動物種の相同遺伝子産物も当然本発明の範囲に包含される。

さらに、本発明のポリペプチド等の検出もしくは精製を容易にするために、または別の機能を付加するために、N末端側やC末端側に別の蛋白質、例えばアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、I g G等の免疫グロブリンF c断片またはF L A G－t a g等のペプチドを直接またはリンカーペプチド等を介して間接的に遺伝子工学的手法等を用いて付加することは当業者には容易であり、これらの別の物質を結合したポリペプチド等も本発明の範囲に包含される。

(ポリヌクレオチド)

一つの態様において、本発明のポリヌクレオチドおよびその相補鎖は、本発明のポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列、例えば配列表の配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドに対する相補鎖を意味する。これらは例えば上記新規 P L A₁ の製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸に関する試薬または標準品としても利用できる。好ましいポリヌクレオチドを示す配列表の配列番号 3 または 4 において、各々塩基番号 1 1 5 の A (a d e n i n e) から塩基番号 1 4 9 4 の A (a d e n i n e) または塩基番号 1 1 の A (a d e n i n e) から塩基番号 1 4 5 3 の A (a d e n i n e) まだがコーディング領域と推定される。また、配列番号 1 のアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 の M (M e t) からアミノ酸番号 1 3 の V (V a l) のまでをコードしている a t g ~ g t g はシグナル配列をコードしているものと推定される。

別の態様において本発明は、本発明のポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列、例えば配列表の配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド、好ましくは配列表の配列番号 3 または 4 の塩基配列で示されるポリヌクレオチドまたはその相補鎖の対応する領域に選択的な条件下、好ましくはストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えばサムブルック等編 [モレキュラークローニング, ア ラボラトリー マニュアル 第 2 版] コールドスプリングハーバーラボラトリー, (1 9 8 9)、又は、ショウ (S h a w) 等に記載の方法 (Nucleic Acids Res., 1 1 巻、555-573 頁、1 9 8 3 年)、又はそれらを適宜一部改変して行うことができる。ここで、選択的ハイブリダイゼーション条件とは、所望

の核酸、例えば、特定のプローブ（例えば、配列番号 3 の本発明の P L A₁ をコードする核酸）と所望の相同性を有する核酸を選択的に又は特異的にハイブリダイズさせ、他の無関係な核酸、例えば、相同性がより低い核酸をハイブリダイズしないような条件をいう。一般的に、核酸の 2 本鎖分子（ハイブリッド）の安定性の指標として融解温度（T_m）が用いられるが、これは鎖の長さ、塩基組成及び化学的条件（イオン強度、化学変性剤の存在等）によって左右され、通常、ハイブリダイゼーションは T_m 以下の温度で実施される。DNA、RNA 又はオリゴヌクレオチドプローブでの完全な相補性のハイブリッドの T_m 値は経験的な実験式が得られている（ヒトの分子遺伝学 (Human Molecular Genetics, Tom Strachan and Andrew P. Read) 村松正貫監修、メディカル・サイエンス・インターナショナル、1997 年他）。その概算値は、プローブが 50 ヌクレオチドより小さい場合、 $T_m (^{\circ}\text{C}) = 4 (G + C) + 2 (A + T)$ [A, T, G, C はプローブ中の各塩基数] で求められる。完全な相補性を選択的に得る為には、ハイブリダイゼーション温度は、T_m より 5[°]C 低いかそれ以上の温度（好ましくは T_m 以下）を用い、又ハイブリッドの安定性を保つためには 1 組の不对合塩基につきハイブリダイゼーション温度を T_m より約 5[°]C 下げる必要がある。又、プローブが 50 ヌクレオチド以上の場合、 $T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.61 \log M + 0.41 (\%G + \%C) - 500/n - 0.61 (\% \text{ホルムアミド})$ [M は溶液の 1 価陽イオン強度 (mol/L)、n は塩基対での 2 本鎖の長さ] の式で計算され、1% の不对合塩基を含む毎に T_m は 1[°]C 減少するので、ハイブリダイゼーション温度もそれに従い調整する。ハイブリダイゼーション温度の目安を完全相補性ハイブリッドの T_m より、例えば、55[°]C、好ましくは 40[°]C、より好ましくは 25[°]C、更に好ましくは 10[°]C、特に好ましくは 5[°]C 低い温度とすることで、所望の相同性の核酸を選択的

にハイブリダイズすることが出来る。具体的には、ショウ (S h a w) 等の方法を一部改変した方法がある。即ち、核酸を結合したフィルター (例えば、ナイロンメンブレン又はニトロセルロースフィルター) を、65℃で一晩、0.1% SDS を含む 3 × SSC (Standard Saline Citrate: 1 × SSC は 0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム) で洗浄し、次いで、50%ホルムアミド、5 × デンハルト溶液、0.1% SDS、250 μg/ml の変性サケ精子 DNA を含む 5 × SSCP (1 × SSCP は、0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム、10 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7.2) 中で、42℃、5時間 (又は 65℃、2時間) プレハイブリダイゼーションする。次に、50%ホルムアミド、1 × デンハルト溶液、0.1% SDS、100 μg/ml の変性サケ精子 DNA、10% (w/v) デキストラン硫酸を含む 5 × SSCP に RI 標識又は非 RI 標識プローブを適量添加し、前記フィルターを 28℃ (好ましくは 37℃、より好ましくは 42℃、更に好ましくは 50℃、特に好ましくは 65℃) で 18時間ハイブリダイゼーションさせる。0.1% SDS を含む 2 × SSCP を用い、室温 (好ましくは 37℃) で 5分間 2回フィルターを洗浄し、次いで、0.1% SDS を含む 0.3 × SSCP を用い、37℃ (好ましくは 50℃、より好ましくは 65℃) で 3回 (計 1時間) 洗浄する。その後、オートラジオグラフィー又は適当な検出方法でプローブの存在を特異的に検出する。ハイブリダイゼーション条件及び洗浄条件等は、使用するプローブ等に応じて適宜組み合わせることが可能である。これらのポリヌクレオチドは目的のポリヌクレオチド、特に配列表の配列番号 3 または 4 の塩基配列で示されるポリヌクレオチドまたはその相補鎖にハイブリダイズするものであれば必ずしも相補的配列でなくともよい。例えば、配列表の配列番号 3 または 4 の塩基配列またはその相補

配列に対する相同性において、少なくとも約40%、例えば、約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上である。また本発明のポリヌクレオチドは、指定された塩基配列の領域に対応する連続する10個以上のヌクレオチド、好ましくは15個以上、より好ましくは20個以上の配列からなるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよびそれらの相補鎖を包含する。

これらのポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチド等の製造において、新規PLA₁をコードする核酸、例えば、その遺伝子、もしくはmRNA検出のためのプローブもしくはプライマーとして、または遺伝子発現を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド等として有用である。その意味で、本発明のポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは翻訳領域のみでなく、非翻訳領域に対応するものも包含する。例えば、アンチセンスによって新規PLA₁の発現を特異的に阻害するためには、リパーゼファミリーで保存されているコンセンサス配列領域以外の新規PLA₁に固有な領域の塩基配列を用いることが想定される。一方、保存配列を用いることにより新規PLA₁を含む複数のリパーゼの発現を同時に抑制することも可能と考えられる。ここで、新規PLA₁または同様の活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列の決定は、例えば公知の蛋白質発現系を利用して発現蛋白質の確認を行い、その生理活性、特にホスファチジン酸を分解する活性を指標にして選別することにより行うことができる。無細胞蛋白質発現系を利用する場合は、例えば胚芽、家兎網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用できる(Nature、179、160~161、1957)。

(形質転換体)

上記のような無細胞蛋白質発現系以外にも、本発明は、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術によっても、本発明からなる新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドは提供可能である。本発明の具体例においては、昆虫細胞を利用したが、無論これに限定されるものではない（日本国特許第 2 1 2 9 4 8 7 号および第 2 6 4 4 4 4 7 号：組み替えバキュロウィルス発現ベクターの製法とポリペプチドの合成）。なお、本発明の新規 P L A₁ 遺伝子がコードする P L A₁ は糖蛋白質であるため、ポリペプチドまたはペプチドに糖鎖を付加し得る宿主である動物細胞等の宿主を用いることが好ましい。

形質転換は、自体公知の手段が応用され、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換が行われる。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法であるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系の利用である。ベクターは、選択した宿主の種類により選別され、発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。組合せは原核細胞、真核細胞によって分別され、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組合せて利用できる。本発明の具体例においては、バキュロウィルス系を利用したが、無論これに限定されるものではない。

形質転換体は、自体公知の各宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養される。培養は、発現産生される新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドの酵素活性、特にホスファチジン酸

を分解する酵素活性を指標にして行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチにより生産してもよい。

(新規 P L A₁ およびその由来物回収)

培地からの新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドの回収は、ホスファチジン酸を分解する酵素活性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を組合せるか、溶解度差にもとづく硫酸、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。好ましくは、アミノ酸配列の情報に基づき、該アミノ酸配列に対する抗体を作成し、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。

(抗体)

抗体は、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドの抗原決定基を選別し、作製する。抗原は新規 P L A₁ またはその断片でもよく、少なくとも 8 個、好ましくは少なくとも 10 個、より好ましくは少なくとも 12 個、さらに好ましくは 15 個以上のアミノ酸で構成される。新規 P L A₁ に特異的な抗体を作製するためには、リパーゼファミリーのコンセンサス配列領域以外の新規 P L A₁ に固有な配列からなる領域を用いることが好ましい。このアミノ酸配列は、必ずしも配列表の配列番号 1 または 2 と相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位が不連続部位であれば、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であることも有効である。抗体は、免疫学的に新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを結合または認識する限り特に限定されな

い。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定される。

抗体を産生するためには、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを、単独または担体に結合して、アジュバントの存在または非存在下で、動物に対して体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導をおこなうことによって行われる。担体は、自身が宿主に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、兎、やぎ、馬等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得される。好ましい手段としては、免疫アフィニティクロマトグラフィー法である。

モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞（例えば、脾臓またはリンパ節由来）を回収し、自体公知の永久増殖性細胞（例えば、P 3 X 6 3 A g 8 株等の骨髓腫細胞株等）との融合によりハイブリドーマを作製する。これをさらにクローン化した後、本発明の P L A₁ を特異的に認識する抗体を産生しているハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

P L A₁ 活性を抑制し得るポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、直接本発明からなる新規 P L A₁ に結合し、その活性を制御することができ、リン脂質特に P A からの L P A 産生系の制御を容易に行うことができる。そのため、L P A が関連する各種悪益的疾患の治療お

よび／または予防のために有用である。

(化合物の同定・スクリーニング方法)

かくして調製された新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、またはこれらを用いる蛋白質合成系並びに新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数を組合せることによって、新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する活性の調節物質または調節剤、例えば活性阻害剤または活性賦活剤の同定方法またはスクリーニング方法に有効な手段を提供する。例えば、ペプチドまたはポリペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質合成系を利用した遺伝子レベルでの発現調節剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等が、自体公知の医薬品スクリーニングシステムにおいて、利用可能である。ここで上記の調節とは、阻害、拮抗、活性化、活性促進、活性賦活等を含む。

また、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドまたは本発明のポリヌクレオチドもしくは形質転換体は、スクリーニング候補の化合物とこれらペプチドまたはポリペプチド等との間の相互作用を可能にする条件を選別し、この相互作用の有無を検出することのできるシグナル（マーカー）を使用する系を導入し、このシグナル（マーカー）の存在もしくは不存在、またはシグナル量の変化を検出することにより、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドの活性を賦活もしくは阻害する化合物、ま

たは本発明のポリヌクレオチドの発現を阻害もしくは促進する化合物を同定することができる。シグナル（マーカー）を使用する系としては、本発明のポリペプチドの活性、例えば、P A等の基質を分解する活性を測定する系またはポリヌクレオチドの発現量を測定する系が含まれ、具体的には実施例に例示されている。これらは公知の方法を応用してもよい。

また本発明の新規P L A₁またはその由来物からなるポリペプチドを発現させた形質転換体と、該形質転換体中で発現される新規P L A₁またはその由来物からなるポリペプチドがホスファチジン酸に作用することにより生産されるリゾホスファチジン酸に対する受容体を発現させた別の形質転換体とを用い、化合物と前記ポリペプチドまたはこれら形質転換体の相互作用を可能にする条件下で、前記ポリペプチドまたはこれら形質転換体とスクリーニングすべき化合物とを接触させて、化合物と形質転換体との相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、新規P L A₁およびその由来物からなるポリペプチドまたは本発明のポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を阻害もしくは活性化する化合物を同定することができる。上記形質転換体としては、例えば本発明の新規P L A₁またはその由来物からなるポリペプチドを発現させたS f 9細胞と、L P A受容体E D G 7を発現させたS f 9細胞との組み合わせが挙げられるが、これに限定されない。また、本発明の新規P L A₁およびその由来物からなるポリペプチドの作用を検出するためのシグナルとしては、例えばL P A受容体E D G 7発現細胞にL P Aが結合することにより上昇する細胞内カルシウムを検出すればよい。細胞内カルシウムの検出はF u r a 2等を用いる自体公知の測定法を応用することができる。なお、本発明のポリペ

チド等を他のリパーゼの相同物（すなわち、ポリペプチド等）またはL P Aに置き換えた対照系における反応と比較することにより、化合物の作用の特異性を確認することができる。また、各形質転換体は、対応する遺伝子の発現が確認された細胞株などに置き換えてもよい。

（化合物、医薬組成物）

このようにして同定された化合物は、新規P L A₁およびその由来物からなるペプチドおよびポリペプチドに関する、活性もしくは作用の阻害剤、拮抗剤、活性化剤、促進剤、または賦活剤の候補化合物として、利用可能である。また、遺伝子レベルでの新規P L A₁およびその由来物に対する発現阻害剤、発現拮抗剤、発現活性化剤、発現促進剤、発現賦活剤の候補化合物としても利用可能である。その効果は、L P Aに由来する各種悪益的症状の予防および／または治療を期待できる。

かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、医薬組成物として調製可能である。また本発明からなる新規P L A₁およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらの塩基配列を含むベクター並びに、新規P L A₁およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それ自体を、診断マーカーもしくは試薬等の疾病診断手段として、または新規P L A₁の発現、活性、もしくは作用を阻害、拮抗、活性化、促進、賦活する機能を利用した治療薬等の医薬手段として使用し得る。なお、製剤化にあたっては、ペプチドまたはポリペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、抗体等各対象に応じた自体公知の製剤化手段を導入すればよい。

上記医薬組成物は、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、形質転換体、抗体、および上記本発明の化合物を利用して製造することが可能である。上記医薬組成物は、P L A₁ 特に新規 P L A₁ に関連する疾患の治療に有用である。

診断手段としては、本発明の新規 P L A₁ およびその由来物からなるペプチドまたはポリペプチドの発現または活性に関連する疾患の診断手段として有用であり、診断は例えば当該ペプチドをコードしている核酸配列との相互作用や反応性を利用して、相応する核酸配列の存在量を決定すること、および／または当該ペプチドについて個体中の生体内分布を決定すること、および／または当該ペプチドの存在、個体由来の試料中の存在量または活性量を決定すること等によって行われる。すなわち、新規 P L A₁ を診断マーカーとして検定するのである。その測定法は、自体公知の抗原抗体反応系、酵素反応系、P C R 反応系等を利用すればよい。さらに、公知の方法により単一ヌクレオチド多型 (S N P) を検出することも有用な診断手段である。

実施例

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

(遺伝子の単離)

ホスファチジルセリンを特異的に加水分解するラットホスホリパーゼ A₁ (P S - P L A₁) (J . B i o l . C h e m . , 2 7 2 , (4) , 2 1

92-2198, 1997) のアミノ酸配列をプローブとして、dbEST (database of Expressed Sequence Tags) に対して、ホモロジーサーチ (tblastn search) を実施した。その結果、未知の核酸配列で相同性スコアの比較的高かった、受託番号 (accession no.) AA470035 のEST配列を得た。

次に、受託番号 (accession no.) AA470035の核酸配列をプローブとして、GenBankに対してホモロジーサーチ (blastn search) を実施した。その結果、受託番号 (accession no.) AP006556の配列とAP001347が明らかとなった。これらの配列を基に、プライマーを設計し、ヒト精巣全RNAからオリゴdTプライマーで作製したfirst strandを鋳型として、PCR法により配列を確認した。5'側の配列が決定困難であったので、ATTTTGTTCAAACAGTGGCTCAGCAのヌクレオチド配列を有するprimer A (配列番号5) およびTTCAAACAGTGGCTCAGCACAGTTTのヌクレオチド配列を有するprimer B (配列番号6) ならびにMarathon-ReadyTM cDNA Human Testis (Clontech) を用いて5' - RACE法により確認した。その結果、alternative splicingによると考えられる、第一エクソンの長さが異なる2種類のアイソフォームの配列(「short-type」および「long-type」と記載することがある) が確認された。次に、これらの配列を並べ、その特色を解析した。PS-PLA₁や、リパーゼに特色的な、活性トライアドのアミノ酸残基や立体構造的に活性ポケット近傍にあるリッドと呼ばれるループ構造領域 (B. B.

A., 1376, 417-432, 1998) (Biochemistry, 32, 4702-4707, 1993) (蛋白質 核酸 酵素, 44, 1038-1042, 1999) が存在することが予測され、その配列上の特色から新規なホスホリパーゼ A₁ である可能性が推測された。

(新規配列のクローニング)

実際に、上記解析で予測された新規 P L A₁ 遺伝子配列を有する c D N A をクローニングする目的で、フォワードプライマーとして配列表の配列番号 7 (Primer C: 5' - C G C G G A T C C A T G T T G C T C A A A T G T T T A C A T A A T - 3') または配列表の配列番号 8 (Primer D: 5' - C G C G G A T C C A T G A G A G T A T A C A T T T T T C T T T G T - 3') およびリバースプライマーとして配列表の配列番号 9 (Primer E: 5' - A A A T A T G C G G C C G C T T A T G T G T T C T T T G G T G T A C A T G T - 3') の塩基配列のオリゴヌクレオチドを組み合わせて、ヒトの精巣由来の R N A (C l o n t e c h) を用いて、R T - P C R した。増幅された 2 種類の遺伝子断片 (約 1.7 k b p) を、各々プラスミド p F A S T B a c 1 (ライフテックオリエンタル社) のマルチクローニングサイト中の B a m H I / N o t I 制限酵素サイトに組み込んだ後、大腸菌 J M 1 0 9 にトランスフェクションし、ポジティブクローンを選択して、クローン化した。プラスミドを回収し、常法により塩基配列を確認した。なお、配列表の配列番号 3 の塩基配列のコード領域 (s h o r t - t y p e に相当) を有するプラスミド (pFASTBac-PAPLA1β) を受託番号 F E R M P - 1 8 0 7 2 として、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧名称: 工業技術院生命工学工業技術研究所) (住所: 〒305-8566 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に 2 0 0 0 年

10月5日付で寄託した。更に該プラスミドは、平成13年(2001)8月8日付けで、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約に従う国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7697が付与されている。

この配列表の配列番号3 (short-type) または配列番号4 (long-type) に記載のcDNAは、配列表の配列番号1または2に記載の各々460または481アミノ酸残基からなる蛋白質を暗号化可能な、各々1380または1443塩基からなるオープンリーディングフレームを含み、少なくとも配列番号3 (short-type) ではN末端領域に、シグナル配列と予想される領域を有していた。アミノ酸配列的な特色としては、アスパラギングリコシレーションサイトのモチーフであるN-{P}-[ST]-{P}. をshortおよびLong-type共に2箇所ずつ(N(Asn)63-L(Leu)66およびN(Asn)396-S(Ser)399、ならびに、N(Asn)84-L(Leu)87およびN(Asn)417-S(Ser)420)) 有していた。

(既存蛋白質との相同性)

塩基配列の翻訳によって予想されるアミノ酸配列を用いて、既存のデータベース(Genbank)に対してtblastnを用いたホモロジーサーチを実施した。その結果、本発明の新規リパーゼ(新規PLA₁)(colon lipase)はヒトPS-PLA₁(hPS-PLA₁)、膵臓型リパーゼ(human pancreatic lipase)、肝臓型リパーゼ(hepatic lipase)、リポプロテインリパーゼ(lipoprotein lipase)、膵臓リパーゼ関連蛋白質1(plrpl; pancreatic lipase r

elated protein 1) および 2 (plrp2; pancreatic lipase related protein 2) と有意な相同性を示した。その他、立体構造的にリパーゼと相同性が高い領域があるとされるピテロジェニンとの相同性も高かった。これらの相同性が高かった既知蛋白質配列のうちピテロジェニンを除く上記各蛋白質において、酵素活性トライアドと予測されるアミノ酸残基（本発明の short および long-type のポリペプチドにおいては、S (Ser) 159、D (Asp) 183、H (His) 253 および S (Ser) 180、D (Asp) 204、H (His) 274) がすべて保存されているのが確認されたので、これらの配列を GENETYX Multiple Alignment モジュール（ソフトウェア開発株式会社）を用いて、マルチプルアラインメントを解析した。

その結果、配列表の配列番号 1 および 2 のアミノ酸配列においては、図 1 に示すように、共にリパーゼファミリーに保存されているコンセンサス配列 G X S X G (G (Gly) 157 - G (Gly) 161 および G (Gly) 178 - G (Gly) 182)、I T G L D (I (Ile) 179 - D (Asp) 183 および I (Ile) 200 - D (Asp) 204) および C X H (C (Cys) 251 - H (His) 253 および C (Cys) 272 - H (His) 274) (X は任意のアミノ酸を示す) が存在し、これらには触媒活性トライアドと考えられるアミノ酸残基が全て含まれていることが判明した。また、立体構造的に活性トライアドが存在するポケットの近傍に存在し、リパーゼの活性発現を調節しているリッドと呼ばれるループ構造 (P (Pro) 239 - K (Lys) 250 および P (Pro) 260 - K (Lys) 271) が、P S - P L A₁ のそれと同じ残基数すなわち 12 個存在することが判明した。通

常、P S - P L A₁以外のリパーゼ群は、リッド構造のアミノ酸残基数が長く、コリパーゼと呼ばれる蛋白性の因子が結合することによって活性が発現されることが知られている (B. B. A., 1376, 417-432, 1998) (Biochemistry, 32, 4702-4707, 1993) (蛋白質 核酸 酵素, 44, 1038-1042, 1999) が、比較的リッドが短いP S - P L A₁については、コリパーゼの必要性は、現在まで明らかにされていない。従って、今回得た塩基配列から翻訳される蛋白質も、P S - P L A₁に似た機構で活性を発現する可能性も予測される。

次に、GENETYX Evolutional tree (UPGMA method) モジュール (ソフトウェア開発株式会社) によって、P L A₁ リパーゼファミリーについて配列の進化的な系統樹を予測した。その結果、新規配列は、P S - P L A₁と最も進化的に近い配列であることが推測された。以上のことから、新規配列が翻訳された蛋白質は、リパーゼ群に近く、特にホスホリパーゼに近縁な新規リパーゼであることが推測された。

(発現組織の確認)

新規P L A₁の発現組織を調べる目的で、ヒト正常組織に対してノザンブロッティングを行った。オープンリーディングフレーム内のc D N A断片である約0.5 k b pのP C R断片をプローブとして用いた。すなわち、P C Rプライマーとして、配列表の配列番号10に記載のAAAAACACCAGAAAAGTTGCTGTGAG (フォワードプライマー配列: 配列番号3の塩基配列の塩基番号493-518に相当) および配列表の配列番号11に記載のGCTTGATAACCCAGCCGAGGACATG (リバースプライマー配列:

配列番号 3 の塩基配列の塩基番号 1 0 0 1 - 1 0 2 5 の相補鎖に相当) の塩基配列で示されるオリゴヌクレオチドを合成し、PCRをおこなうことにより³²P 標識プローブを調製した。ノザンブロッティングは、Human Multiple Tissue Northern Blot (Clontech) を用いてユーザーマニュアル (PT1200-1, Clontech) に従って実施した。その結果、検討した正常組織 (心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、白血球) においては、精巣において mRNA の高い発現が認められた。

(LPA 受容体との関係)

本発明の新規 PLA₁ は、PA に作用して加水分解し、2-アシル LPA を産生する PLA₁ (特願平 1 1 - 1 8 7 0 8 9) と最も高いアミノ酸配列上の相同性 (約 4 5 %) を示したことから、同様の活性を有する可能性が考えられた。従って、新規 PLA₁ は、生体内での機能として、LPA を生産して LPA 受容体にリガンドとして供給している可能性がある。LPA 受容体は、EDG 2、EDG 4、および EDG 7 が知られているが、中でも EDG 7 は、不飽和脂肪酸を含む LPA に対し強い反応性を示し、1-acyl-LPA より 2-acyl-LPA に強く反応するユニークな受容体であり、そのリガンド特異性は EDG 2、EDG 4 とは異なる (J. Biol. Chem., 274, pp 2777, 6-27785, 1999)。EDG 7 を介するシグナル伝達には何らかの PLA₁ 反応が関与することが予想されるので、新規 PLA₁ と EDG 7 の生体組織における発現をノザンブロッティング法により調べたところ、両方の mRNA が精巣によく発現していた。

次に、新規 PLA_1 が PA を加水分解して LPA を産生し、 $EDG7$ にリガンドとして供給する可能性について検討した。図3に示すバイオアッセイ系を用いて、 LPA が新規 PLA_1 によって生産され得るか検討をおこなった。バイオアッセイ系には、 LPA への反応性を欠く昆虫細胞 $Sf9$ を使用した。 $Sf9$ 細胞に、新規 PLA_1 を上記のバキュロウイルス系を用いて発現させた（以下、酵素側と呼ぶこともある）。すなわち、上記でクローン化した組換え $pFASTBac$ プラスミドを、 $DH10BAC^{TM}$ コンピテントセル（GIBCO BRL）にトランスフェクションし、組換え $Bacmid$ を回収した。得られた $Bacmid$ は、 $Cellfectin^{TM}$ とともに $Sf9$ 細胞（夜盗蛾 *Spodoptera frugiperda* さなぎ卵巣組織由来）にトランスフェクションした。その結果、組換え型バキュロウイルス（*Baculovirus*）が培養上清中に回収された。回収した組換えウイルスを感染させることにより新規 PLA_1 を発現する $Sf9$ 細胞を得た。また、 LPA 受容体である $EDG7$ を、J. Biol. Chem., 274, pp 27776-27785, 1999に記載の方法に準じてバキュロウイルス系を用いて $Sf9$ 細胞に発現させた（以下、受容体側と呼ぶこともある）。この系においては、新規 PLA_1 が十分に発現されて LPA が産生されれば、 LPA 受容体を発現している細胞に LPA が結合して細胞内シグナル伝達が惹起され、カルシウムイオン（ Ca^{2+} ）の細胞内濃度が上昇する。すなわち、新規 PLA_1 の *in vitro* での LPA 産生とその作用を、 Ca^{2+} の濃度変化を検出することにより、検討することができる。 Ca^{2+} 濃度変化の測定は、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 *Fura-2* を用いて行った。まず、 LPA 受容体を発現させた $Sf9$ 細胞を $Sf9$ カルシウムアッセイ用栄養液（10 mM $CaCl_2$, 60 mM KCl , 17 mM $MgCl_2$, 10 mM $NaCl$, 10 mM MES , 4 mM

M グルコース, 110 mM シュークロース, 0.1%ウシ血清アルブミン)に 5×10^5 細胞/mlとなるように懸濁し、2 μ M Fura 2-AMを27°Cで1時間取り込ませた。その後、上記栄養液で2回洗浄後、上記栄養液中に 5×10^5 細胞/mlとなるように懸濁した。新規PLA₁を発現させたSf9細胞は、上記栄養液に 5×10^5 細胞/50 μ lとなるように懸濁し、30分間培養した。キュベット中に上記で調製したLPA受容体発現細胞を1 ml加え、マイクロスターラーで攪拌しながら340 nmおよび380 nmの励起光をあて、それぞれの500 nmでの蛍光強度とその比を、CAF-110型細胞内イオン測定装置(日本分光工業株式会社)により測定した。これに新規PLA₁発現細胞を50 μ l加えて同様に測定を行った。また、それぞれの測定時に、Triton-X100を添加して全Fura 2と細胞外Ca²⁺が結合した時の値と、EGTAを加えて全Ca²⁺がキレートされてFura 2が解離した時の値を同様に測定した。上記各測定値を用いて、下記式により、細胞内カルシウム濃度を算出した。

$$[Ca^{2+}] (nM) = 224 \times b / a \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

上記式において、224はFura 2の解離定数、aはTriton X-100を加えて全Fura 2と細胞外Ca²⁺が結合した時の380 nm励起光による蛍光強度、bはEGTAを加え全Ca²⁺がキレートされてFura 2が解離した時の380 nm励起光による蛍光強度、Fは340 nm励起光による蛍光強度/380 nm励起光による蛍光強度の比、F_{max}はTriton X-100を加えて全Fura 2と細胞外Ca²⁺が結合した時のF、F_{min}はEGTAを加え全Ca²⁺がキレートされてFura 2が解離したときのFである。

その結果、EDG7を発現させたSF9細胞に、新規PLA₁発現SF9細胞の培養上清を加えると細胞内Ca²⁺濃度の上昇が観察された(図4A)。この現象は、受容体側または酵素側を野生型(wild-type)バキュロウイルスで感染させた細胞に変えた場合には観察されなかった。以上のことから、新規PLA₁は細胞内で内在性のPAを基質として加水分解してLPAを産生し、LPA受容体であるEDG7を発現している細胞に作用していることが示唆された。

(新規PLA₁が媒介するLPA産生におけるPLDの関与)

膜リン脂質をPAに変換するホスホリパーゼD(PLD)は、卵巣癌細胞によるLPA産生においても関与している。新規PLA₁によるLPA産生におけるPLDの役割を見出すために、上記の新規PLA₁発現SF9細胞を放線菌由来のPLDで処理し、30分後の培養上清を回収した。この培養上清をLPA受容体EDG7発現SF9細胞に作用させ、細胞内カルシウムを上述のように測定した。その結果、PLDを処理しない場合に比べてより低濃度で細胞内Ca²⁺応答を誘導した。すなわち、新規PLA₁はLPA(おそらく2-acetyl-1-lysophosphatidic acid)をPLDの活性化との協同作用により産生するものと考えられた。

産業上の利用可能性

本発明は、PLA₁リパーゼファミリーに属する新規PLA₁を提供するものである。新規PLA₁はホスファチジン酸(PA)に対する基質特異性を有する細胞結合性の糖蛋白質であり、PAを加水分解してリゾホスファチジン酸(LPA)を産生させるものである。さらに本発明は、新規なPA特異的リパーゼ(PLA₁)による細胞におけるLPA産生と、LPA受容体であるEDG7への細胞からのLPAの受け渡し機構

の存在を見出したことにより、PLA₁ファミリーの生理的意義、LP
A受容体のリガンドを産生する機構を解明する手がかりを提供するもの
であり、この知見を利用した新規医薬組成物、診療手段の提供は、リパ
ーゼ関連の臨床ならびに基礎の医用領域において大きな有用性を提供す
る。

請 求 の 範 囲

1. 下記の群より選ばれるポリペプチド；
 - ①配列表の配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド、
 - ②前記①のポリペプチドを含有するポリペプチド、
 - ③前記①のポリペプチドと少なくとも約 70 % のアミノ酸配列上の相同性を有しかつホスファチジン酸を分解する活性を有するポリペプチド、および
 - ④前記アミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつホスファチジン酸を分解する活性を有するポリペプチド。
2. 配列表の配列番号 1 または 2 に記載のアミノ酸配列の、少なくとも約 8 個の連続するアミノ酸配列を有するペプチド。
3. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。
4. 請求の範囲第 3 項に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖と選択的な条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。
5. 配列表の配列番号 3 または 4 に記載の塩基配列またはその相補的配列の、少なくとも約 15 個の連続する塩基配列で示されるポリヌクレオチド。
6. 請求の範囲第 3 項ないし第 5 項に記載の何れかのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
7. 請求の範囲第 6 項に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
8. 請求の範囲第 7 項に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求

の範囲第 1 項または第 2 項に記載のポリペプチドまたはペプチドの製造方法。

9. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のポリペプチドまたはペプチドを免疫学的に認識する抗体。

10. ホスファチジン酸を分解する活性を抑制する、請求の範囲第 9 項に記載の抗体。

11. 請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、および／または請求の範囲第 3 項もしくは第 4 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のポリペプチドもしくはペプチド、請求の範囲第 3 項ないし第 5 項に記載の何れかのポリヌクレオチド、請求の範囲第 6 項に記載のベクター、請求の範囲第 7 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 9 項もしくは第 10 項に記載の抗体のうち、少なくとも何れか一つを用いることを特徴とする方法。

12. 請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、または請求の範囲第 3 項もしくは第 4 項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物の同定方法であって、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの間の相互作用を可能にする条件下で、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し（かかる相互作用はポリペプチドまたはポリヌクレオチドと化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第 2 の成分に関連したものである）、次いで、化合物とポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、化合物がポリペプチド

またはポリヌクレオチドと相互作用して、その活性を活性化または阻害するかどうかを決定することを含む方法。

13. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチドまたは請求の範囲第3項もしくは第4項に記載のポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を阻害もしくは活性化する化合物の同定方法であって、請求の範囲第7項に記載の形質転換体と、該形質転換体中で発現される請求の範囲第1項に記載のポリペプチドがホスファチジン酸に作用することにより生産されるリゾホスファチジン酸に対する受容体を発現させた別の形質転換体とを用い、化合物とこれら形質転換体の相互作用を可能にする条件下で、これら形質転換体とスクリーニングすべき化合物とを接触させて化合物の相互作用を評価し（かかる作用は形質転換体と化合物との相互作用に応答した検出可能シグナルを提供し得る第2の成分に関連したものである）、次いで、化合物と形質転換体との相互作用により生じるシグナルの存在または不存在またはその変化を検出することにより、化合物がポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性または生理学的作用を、活性化または阻害するかどうかを決定することを含む方法。

14. 請求の範囲第11項ないし第13項に記載の方法で同定される化合物。

15. 請求の範囲第1項に記載のポリペプチドと相互作用してその活性を阻害もしくは活性化する化合物、または請求の範囲第3項もしくは第4項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害もしくは促進する化合物。

16. 請求の範囲第1項または第2項に記載のポリペプチドもしくはペプチド、請求の範囲第3項ないし第5項に記載の何れかのポリヌクレオチド、請求の範囲第6項に記載のベクター、請求の範囲第7項に記載の形質転換体、請求の範囲第9項もしくは第10項に記載の抗体、または

請求の範囲第 1 4 項または第 1 5 項に記載の化合物のうち、少なくとも何れか一つを含有することを特徴とする医薬組成物。

17. 個体における請求の範囲第 1 項に記載のポリペプチドの発現または活性に関連した疾病の診断方法であって、(a)該ポリペプチドをコードしている核酸配列、および／または(b)個体由来の試料中の該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む方法。

18. 請求の範囲第 1 6 項に記載の医薬組成物をホスホリパーゼ A₁に関連する疾患に用いることを特徴とする治療方法。

19. 請求の範囲第 1 6 項に記載の医薬組成物の製造方法。

10 20 30 40 50 60
 ttttacagaa gaacctgccg gcctgtgatg atcctaccaa agagaaacct caatgagtta
 tggaatttcc tttttggtga attgagtgcct gtttttgctt ttctcagatt ccaaATGAGA

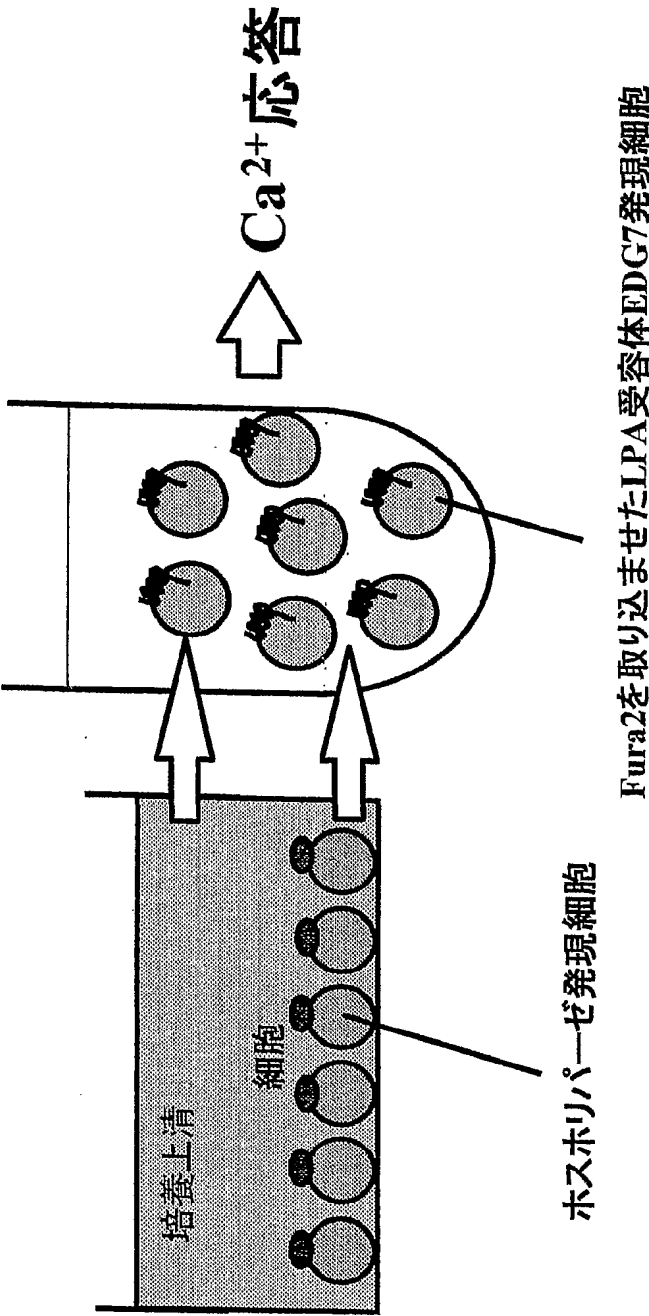
M R

GTATACATTT TTCTTTGTTT GATGTGCTGG GTGAGATCTG ATAATAAAAG ACCATGCCTT
V Y I F L C L M C W V R S D N K R P C L
 GAATTCTCTC AGCTAAGTGT AAAGGATTCC TTCAGAGATT TATTTATTCC GAGAATAGAG
 E F S Q L S V K D S F R D L F I P R I E
 ACCATTCTGA TGATGTATAC AAGGAACAAC CTAAACTGTG CTGAGCCACT GTTTGAACAA
 T I L M M Y T R N N L N C A E P L F E Q
 AATAACTCAC TTAATGTAA TTTCAACACA CAAAAGAAAA CAGTCTGGCT TATTCACGGA
N N S L N V N F N T Q K K T V W L I H G
 TACAGACCAG TAGGCTCCAT CCCATTATGG CTTCAGAACT TCGTAAGGAT TTTGCTGAAT
 Y R P V G S I P L W L Q N F V R I L L N
 GAAGAAGATA TGAATGTAAT TGTAGTAGAC TGGAGCCGGG GTGCTACAAC TTTTATTTAT
 E E D M N V I V V D W S R G A T T F I Y
 AATAGAGCAG TTAAAAACAC CAGAAAAGTT GCTGTGAGTT TGAGTGTGCA CATTAAAAAT
 N R A V K N T R K V A V S L S V H I K N
 CTTTTGAAGC ATGGTGCATC TCTTGACAAT TTTCATTTCA TAGGTGTGAG TTTAGGGGCT
 L L K H G A S L D N F H F I G V S L G A
 CATATCAGTG GATTTGTTGG AAAGATATTT CATGGTCAAC TTGGAAGAAT AACAGGTCTT
 H I S G F V G K I F H G Q L G R I T G L
 GACCCTGCTG GGCCAAGGTT CTCCAGAAAA CCACCATATA GCAGATTAGA TTACACGGAT
D P A G P R F S R K P P Y S R L D Y T D
 GCAAAGTTTG TGGATGTCAT CCATTCTGAC TCCAATGGTT TAGGCATTCA AGAGCCCTTG
 A K F V D V I H S D S N G L G I Q E P L
 GGACATATAG ATTTTTATCC AAATGGAGGA AATAACAAC CTGGCTGTCC TAAATCAATT
 G H I D F Y P N G G N K Q P G C P K S I
 TTCTCAGGAA TTCAATTCAT TAAATGCAAC CACCAGAGAG CAGTTCACTT GTTCATGGCA
 F S G I Q F I K C N H Q R A V H L F M A

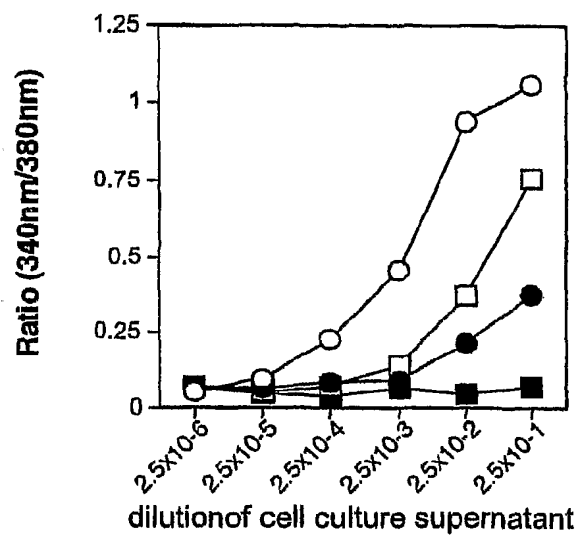
 2

TCTTTAGAAA CAAACTGCAA TTTTATTTC TTTCTTGTC GTTCATACAA AGATTACAAG
 S L E T N C N F I S F P C R S Y K D Y K
 ACTAGCTTAT GTGTGGACTG TGA CTGTTTT AAGGAAAAAT CATGTCCTCG GCTGGGTTAT
 T S L C V D C D C F K E K S C P R L G Y
 CAAGCCAAGC TATTTAAAGG TGTTTTAAAA GAAAGGATGG AAGGAAGACC TCTTAGGACC
 Q A K L F K G V L K E R M E G R P L R T
 ACTGTGTTTT TGGATACAAG TGGTACATAT CCATTCTGTA CCTATTATTT TGTTCCTCAGT
 T V F L D T S G T Y P F C T Y Y F V L S
 ATAATTGTTT CAGATAAAAC TATGATGGAT GGCTCGTTTT CATTAAATT ATTAATCAG
 I I V P D K T M M D G S F S F K L L N Q
 CTTGGAATGA TTGAAGAGCC AAGGCTTTAT GAAAAGAACA AACCATTTTA TAACTTCAA
 L G M I E E P R L Y E K N K P F Y K L Q
 GAAGTCAAGA TTCTTGCTCA ATTTTATAAT GACTTTGTAA ATATTTCAAG CATTGGTTTG
 E V K I L A Q F Y N D F V N I S S I G L
 ACATATTTCC AGAGCTCAAA TCTGCAGTGT TCCACATGCA CATACAAGAT CCAGAGACTC
 T Y F Q S S N L Q C S T C T Y K I Q R L
 ATGTTAAAT CACTTACATA CCCAGAAAGA CCACCACTTT GCAGGTATAA TATTGTA CTT
 M L K S L T Y P E R P P L C R Y N I V L
 AAAGACAGAG AGGAAGTGTT TCTTAATCCA AACACATGTA CACCAAAGAA CACATAAgat
 K D R E E V F L N P N T C T P K N T *
 gcccttcttcc atcaaatgca ctgtgtgtg aattaatgga ctgtgaaatg aaacaatgca
 atcagtccttt tataatgcac tgttcaattt gagattcaag tatttctatt tcttggaataa
 aattttaaga atcaaaaata aagaaaataa aaaatgcata cagttaaaca ttccaaa

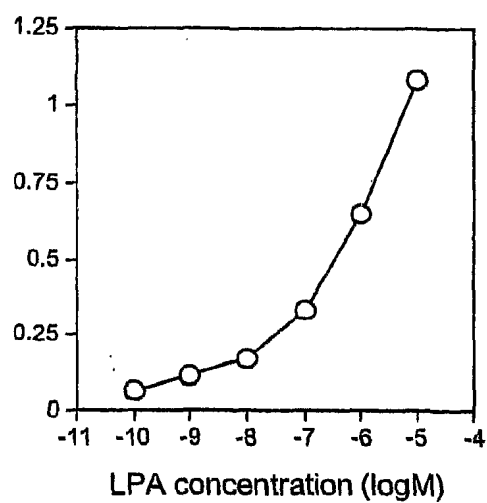
図 3



④ 4

A

- PA-PLA₁β + PLD
- PA-PLA₁β - PLD
- Wildtype + PLD
- Wildtype - PLD

B

配列表 (SEQUENCE LISTING)

配列番号 1

Molecule sequenced :

Gene name :

Sequence length : 1677 base pairs

TTTACAGAA GAACCTGCCA GCCTGTGATG ATCCTACCAA AGAGAAACCT CAATGAGTTA 60

TGGAATTTCC TTTTGGTGA ATTGAGTGCT GTTTTGCTT TTCTCAGATT CCAA ATG 117

MET

1

AGA GTA TAC ATT TTT CTT TGT TTG ATG TGC TGG GTG AGA TCT GAT AAT 165

Arg Val Tyr Ile Phe Leu Cys Leu MET Cys Trp Val Arg Ser Asp Asn

5

10

15

AAA AGA CCA TGC CTT GAA TTC TCT CAG CTA AGT GTA AAG GAT TCC TTC 213

Lys Arg Pro Cys Leu Glu Phe Ser Gln Leu Ser Val Lys Asp Ser Phe

20

25

30

AGA GAT TTA TTT ATT CCG AGA ATA GAG ACC ATT CTG ATG ATG TAT ACA 261

Arg Asp Leu Phe Ile Pro Arg Ile Glu Thr Ile Leu MET MET Tyr Thr

35

40

45

AGG AAC AAC CTA AAC TGT GCT GAG CCA CTG TTT GAA CAA AAT AAC TCA 309

Arg Asn Asn Leu Asn Cys Ala Glu Pro Leu Phe Glu Gln Asn Asn Ser

50

55

60

65

CTT AAT GTT AAT TTC AAC ACA CAA AAG AAA ACA GTC TGG CTT ATT CAC 357

Leu Asn Val Asn Phe Asn Thr Gln Lys Lys Thr Val Trp Leu Ile His	
70 75 80	
GGA TAC AGA CCA GTA GGC TCC ATC CCA TTA TGG CTT CAG AAC TTC GTA	405
Gly Tyr Arg Pro Val Gly Ser Ile Pro Leu Trp Leu Gln Asn Phe Val	
85 90 95	
AGG ATT TTG CTG AAT GAA GAA GAT ATG AAT GTA ATT GTA GTA GAC TGG	453
Arg Ile Leu Leu Asn Glu Glu Asp MET Asn Val Ile Val Val Asp Trp	
100 105 110	
AGC CGG GGT GCT ACA ACT TTT ATT TAT AAT AGA GCA GTT AAA AAC ACC	501
Ser Arg Gly Ala Thr Thr Phe Ile Tyr Asn Arg Ala Val Lys Asn Thr	
115 120 125	
AGA AAA GTT GCT GTG AGT TTG AGT GTG CAC ATT AAA AAT CTT TTG AAG	549
Arg Lys Val Ala Val Ser Leu Ser Val His Ile Lys Asn Leu Leu Lys	
130 135 140 145	
CAT GGT GCA TCT CTT GAC AAT TTT CAT TTC ATA GGT GTG AGT TTA GGG	597
His Gly Ala Ser Leu Asp Asn Phe His Phe Ile Gly Val Ser Leu Gly	
150 155 160	
GCT CAT ATC AGT GGA TTT GTT GGA AAG ATA TTT CAT GGT CAA CTT GGA	645
Ala His Ile Ser Gly Phe Val Gly Lys Ile Phe His Gly Gln Leu Gly	
165 170 175	
AGA ATA ACA GGT CTT GAC CCT GCT GGG CCA AGG TTC TCC AGA AAA CCA	693
Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro Arg Phe Ser Arg Lys Pro	

180	185	190	
CCA TAT AGC AGA TTA GAT TAC ACG GAT GCA AAG TTT GTG GAT GTC ATC	741		
Pro Tyr Ser Arg Leu Asp Tyr Thr Asp Ala Lys Phe Val Asp Val Ile			
195	200	205	
CAT TCT GAC TCC AAT GGT TTA GGC ATT CAA GAG CCC TTG GGA CAT ATA	789		
His Ser Asp Ser Asn Gly Leu Gly Ile Gln Glu Pro Leu Gly His Ile			
210	215	220	225
GAT TTT TAT CCA AAT GGA GGA AAT AAA CAA CCT GGC TGT CCT AAA TCA	837		
Asp Phe Tyr Pro Asn Gly Gly Asn Lys Gln Pro Gly Cys Pro Lys Ser			
230	235	240	
ATT TTC TCA GGA ATT CAA TTC ATT AAA TGC AAC CAC CAG AGA GCA GTT	885		
Ile Phe Ser Gly Ile Gln Phe Ile Lys Cys Asn His Gln Arg Ala Val			
245	250	255	
CAC TTG TTC ATG GCA TCT TTA GAA ACA AAC TGC AAT TTT ATT TCA TTT	933		
His Leu Phe MET Ala Ser Leu Glu Thr Asn Cys Asn Phe Ile Ser Phe			
260	265	270	
CCT TGT CGT TCA TAC AAA GAT TAC AAG ACT AGC TTA TGT GTG GAC TGT	981		
Pro Cys Arg Ser Tyr Lys Asp Tyr Lys Thr Ser Leu Cys Val Asp Cys			
275	280	285	
GAC TGT TTT AAG GAA AAA TCA TGT CCT CGG CTG GGT TAT CAA GCC AAG	1029		
Asp Cys Phe Lys Glu Lys Ser Cys Pro Arg Leu Gly Tyr Gln Ala Lys			
290	295	300	305

CTA TTT AAA GGT GTT TTA AAA GAA AGG ATG GAA GGA AGA CCT CTT AGG 1077
 Leu Phe Lys Gly Val Leu Lys Glu Arg MET Glu Gly Arg Pro Leu Arg
 310 315 320

ACC ACT GTG TTT TTG GAT ACA AGT GGT ACA TAT CCA TTC TGT ACC TAT 1125
 Thr Thr Val Phe Leu Asp Thr Ser Gly Thr Tyr Pro Phe Cys Thr Tyr
 325 330 335

TAT TTT GTT CTC AGT ATA ATT GTT CCA GAT AAA ACT ATG ATG GAT GGC 1173
 Tyr Phe Val Leu Ser Ile Ile Val Pro Asp Lys Thr MET MET Asp Gly
 340 345 350

TCG TTT TCA TTT AAA TTA TTA AAT CAG CTT GGA ATG ATT GAA GAG CCA 1221
 Ser Phe Ser Phe Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gly MET Ile Glu Glu Pro
 355 360 365

AGG CTT TAT GAA AAG AAC AAA CCA TTT TAT AAA CTT CAA GAA GTC AAG 1269
 Arg Leu Tyr Glu Lys Asn Lys Pro Phe Tyr Lys Leu Gln Glu Val Lys
 370 375 380 385

ATT CTT GCT CAA TTT TAT AAT GAC TTT GTA AAT ATT TCA AGC ATT GGT 1317
 Ile Leu Ala Gln Phe Tyr Asn Asp Phe Val Asn Ile Ser Ser Ile Gly
 390 395 400

TTG ACA TAT TTC CAG AGC TCA AAT CTG CAG TGT TCC ACA TGC ACA TAC 1365
 Leu Thr Tyr Phe Gln Ser Ser Asn Leu Gln Cys Ser Thr Cys Thr Tyr
 405 410 415

AAG ATC CAG AGA CTC ATG TTA AAA TCA CTT ACA TAC CCA GAA AGA CCA 1413

Lys Ile Gln Arg Leu MET Leu Lys Ser Leu Thr Tyr Pro Glu Arg Pro

420

425

430

CCA CTT TGC AGG TAT AAT ATT GTA CTT AAA GAC AGA GAG GAA GTG TTT 1461

Pro Leu Cys Arg Tyr Asn Ile Val Leu Lys Asp Arg Glu Glu Val Phe

435

440

445

CTT AAT CCA AAC ACA TGT ACA CCA AAG AAC ACA TAA GATGCCTTCT TCCATC 1513

Leu Asn Pro Asn Thr Cys Thr Pro Lys Asn Thr ***

450

455

460

AAATGCACTT GCTTGTGAAT TAATGGACTT GTAAATGAAA CAATGCAATC AGTCTTTTAT 1573

AATGCACTGT TCAATTTGAG ATTCAAGTAT TTCTATTTCT TGGAAAAAAT TTTAAGAATC 1633

AAAAATAAAG AAAATAAAAA ATGCATACAG TTAACATTC CAAA 1677

配列番号 2

Molecule sequenced :

Gene name :

Sequence length : 1636 base pairs

GGTCTTATTT ATG TTG CTC AAA TGT TTA CAT AAT AAC TTG TGC CAA AAA 49

MET Leu Leu Lys Cys Leu His Asn Asn Leu Cys Gln Lys

1

5

10

TAT AGT GCT CAT GCT TTT CAG TTC TCA CCC AGA AAT GTC CTG TGG CTT 97

Tyr Ser Ala His Ala Phe Gln Phe Ser Pro Arg Asn Val Leu Trp Leu

15

20

25

CTA GTT GTG TGC CTG AGA TCA GAT AAT AAA AGA CCA TGC CTT GAA TTC	145
Leu Val Val Cys Leu Arg Ser Asp Asn Lys Arg Pro Cys Leu Glu Phe	
30 35 40 45	
TCT CAG CTA AGT GTA AAG GAT TCC TTC AGA GAT TTA TTT ATT CCG AGA	193
Ser Gln Leu Ser Val Lys Asp Ser Phe Arg Asp Leu Phe Ile Pro Arg	
50 55 60	
ATA GAG ACC ATT CTG ATG ATG TAT ACA AGG AAC AAC CTA AAC TGT GCT	241
Ile Glu Thr Ile Leu MET MET Tyr Thr Arg Asn Asn Leu Asn Cys Ala	
65 70 75	
GAG CCA CTG TTT GAA CAA AAT AAC TCA CTT AAT GTT AAT TTC AAC ACA	289
Glu Pro Leu Phe Glu Gln Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Asn Thr	
80 85 90	
CAA AAG AAA ACA GTC TGG CTT ATT CAC GGA TAC AGA CCA GTA GGC TCC	337
Gln Lys Lys Thr Val Trp Leu Ile His Gly Tyr Arg Pro Val Gly Ser	
95 100 105	
ATC CCA TTA TGG CTT CAG AAC TTC GTA AGG ATT TTG CTG AAT GAA GAA	385
Ile Pro Leu Trp Leu Gln Asn Phe Val Arg Ile Leu Leu Asn Glu Glu	
110 115 120 125	
GAT ATG AAT GTA ATT GTA GTA GAC TGG AGC CGG GGT GCT ACA ACT TTT	433
Asp MET Asn Val Ile Val Val Asp Trp Ser Arg Gly Ala Thr Thr Phe	
130 135 140	
ATT TAT AAT AGA GCA GTT AAA AAC ACC AGA AAA GTT GCT GTG AGT TTG	481

Ile Tyr Asn Arg Ala Val Lys Asn Thr Arg Lys Val Ala Val Ser Leu	
145 150 155	
AGT GTG CAC ATT AAA AAT CTT TTG AAG CAT GGT GCA TCT CTT GAC AAT	529
Ser Val His Ile Lys Asn Leu Leu Lys His Gly Ala Ser Leu Asp Asn	
160 165 170	
TTT CAT TTC ATA GGT GTG AGT TTA GGG GCT CAT ATC AGT GGA TTT GTT	577
Phe His Phe Ile Gly Val Ser Leu Gly Ala His Ile Ser Gly Phe Val	
175 180 185	
GGA AAG ATA TTT CAT GGT CAA CTT GGA AGA ATA ACA GGT CTT GAC CCT	625
Gly Lys Ile Phe His Gly Gln Leu Gly Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro	
190 195 200 205	
GCT GGG CCA AGG TTC TCC AGA AAA CCA CCA TAT AGC AGA TTA GAT TAC	673
Ala Gly Pro Arg Phe Ser Arg Lys Pro Pro Tyr Ser Arg Leu Asp Tyr	
210 215 220	
ACG GAT GCA AAG TTT GTG GAT GTC ATC CAT TCT GAC TCC AAT GGT TTA	721
Thr Asp Ala Lys Phe Val Asp Val Ile His Ser Asp Ser Asn Gly Leu	
225 230 235	
GGC ATT CAA GAG CCC TTG GGA CAT ATA GAT TTT TAT CCA AAT GGA GGA	769
Gly Ile Gln Glu Pro Leu Gly His Ile Asp Phe Tyr Pro Asn Gly Gly	
240 245 250	
AAT AAA CAA CCT GGC TGT CCT AAA TCA ATT TTC TCA GGA ATT CAA TTC	817
Asn Lys Gln Pro Gly Cys Pro Lys Ser Ile Phe Ser Gly Ile Gln Phe	

255	260	265	
ATT AAA TGC AAC CAC CAG AGA GCA GTT CAC TTG TTC ATG GCA TCT TTA 865			
Ile Lys Cys Asn His Gln Arg Ala Val His Leu Phe MET Ala Ser Leu			
270	275	280	285
GAA ACA AAC TGC AAT TTT ATT TCA TTT CCT TGT CGT TCA TAC AAA GAT 913			
Glu Thr Asn Cys Asn Phe Ile Ser Phe Pro Cys Arg Ser Tyr Lys Asp			
	290	295	300
TAC AAG ACT AGC TTA TGT GTG GAC TGT GAC TGT TTT AAG GAA AAA TCA 961			
Tyr Lys Thr Ser Leu Cys Val Asp Cys Asp Cys Phe Lys Glu Lys Ser			
	305	310	315
TGT CCT CGG CTG GGT TAT CAA GCC AAG CTA TTT AAA GGT GTT TTA AAA 1009			
Cys Pro Arg Leu Gly Tyr Gln Ala Lys Leu Phe Lys Gly Val Leu Lys			
	320	325	330
GAA AGG ATG GAA GGA AGA CCT CTT AGG ACC ACT GTG TTT TTG GAT ACA 1057			
Glu Arg MET Glu Gly Arg Pro Leu Arg Thr Thr Val Phe Leu Asp Thr			
	335	340	345
AGT GGT ACA TAT CCA TTC TGT ACC TAT TAT TTT GTT CTC AGT ATA ATT 1105			
Ser Gly Thr Tyr Pro Phe Cys Thr Tyr Tyr Phe Val Leu Ser Ile Ile			
350	355	360	365
GTT CCA GAT AAA ACT ATG ATG GAT GGC TCG TTT TCA TTT AAA TTA TTA 1153			
Val Pro Asp Lys Thr MET MET Asp Gly Ser Phe Ser Phe Lys Leu Leu			
	370	375	380

AAT CAG CTT GGA ATG ATT GAA GAG CCA AGG CTT TAT GAA AAG AAC AAA 1201

Asn Gln Leu Gly MET Ile Glu Glu Pro Arg Leu Tyr Glu Lys Asn Lys

385

390

395

CCA TTT TAT AAA CTT CAA GAA GTC AAG ATT CTT GCT CAA TTT TAT AAT 1249

Pro Phe Tyr Lys Leu Gln Glu Val Lys Ile Leu Ala Gln Phe Tyr Asn

400

405

410

GAC TTT GTA AAT ATT TCA AGC ATT GGT TTG ACA TAT TTC CAG AGC TCA 1297

Asp Phe Val Asn Ile Ser Ser Ile Gly Leu Thr Tyr Phe Gln Ser Ser

415

420

425

AAT CTG CAG TGT TCC ACA TGC ACA TAC AAG ATC CAG AGA CTC ATG TTA 1345

Asn Leu Gln Cys Ser Thr Cys Thr Tyr Lys Ile Gln Arg Leu MET Leu

430

435

440

445

AAA TCA CTT ACA TAC CCA GAA AGA CCA CCA CTT TGC AGG TAT AAT ATT 1393

Lys Ser Leu Thr Tyr Pro Glu Arg Pro Pro Leu Cys Arg Tyr Asn Ile

450

455

460

GTA CTT AAA GAC AGA GAG GAA GTG TTT CTT AAT CCA AAC ACA TGT ACA 1441

Val Leu Lys Asp Arg Glu Glu Val Phe Leu Asn Pro Asn Thr Cys Thr

465

470

475

CCA AAG AAC ACA TAA GATGCCTTCT TCCATCAAAT GCACTTGCTT GTGAATTAAT G 1497

Pro Lys Asn Thr ***

480

GACTTGTA	AAA	TGAAACA	ATG	CAATCAG	TCT	TTTATA	ATGC	ACTGTT	CAAT	TTGAG	ATTCA	1557
AGTATTT	CTA	TTTCTT	GGAA	AAAATTT	TAA	GAATCA	AAAAA	TAAAGAA	AAAT	AAAAA	TGCA	1617
TACAGTT	AAA	CATTCC	AAA									1636

配列番号 3

SQ Sequence 1677 BP; 554 A; 289 C; 308 G; 526 T; 0 other;

ttttacagaa	gaacctgcca	gcctgtgatg	atcctaccaa	agagaaacct	caatgagtta	60
tggaaatttc	tttttggtga	attgagtget	gtttttgctt	ttctcagatt	ccaaATGAGA	120
GTATACATTT	TTCTTTGTTT	GATGTGCTGG	GTGAGATCTG	ATAATAAAAG	ACCATGCCTT	180
GAATTCTCTC	AGCTAAGTGT	AAAGGATTCC	TTCAGAGATT	TATTTATTCC	GAGAATAGAG	240
ACCATTCTGA	TGATGTATAC	AAGGAACAAC	CTAAACTGTG	CTGAGCCACT	GTTTGAACAA	300
AATAACTCAC	TTAATGTTAA	TTCAACACA	CAAAAGAAAA	CAGTCTGGCT	TATTCACGGA	360
TACAGACCAG	TAGGCTCCAT	CCCATTATGG	CTTCAGAACT	TCGTAAGGAT	TTTGCTGAAT	420
GAAGAAGATA	TGAATGTAAT	TGTAGTAGAC	TGGAGCCGGG	GTGCTACAAC	TTTTATTTAT	480
AATAGAGCAG	TTAAAAACAC	CAGAAAAGTT	GCTGTGAGTT	TGAGTGTGCA	CATTAAAAAT	540
CTTTTGAAGC	ATGGTGCATC	TCTTGACAAT	TTTCATTTCA	TAGGTGTGAG	TTTAGGGGCT	600
CATATCAGTG	GATTTGTTGG	AAAGATATTT	CATGGTCAAC	TTGGAAGAAT	AACAGGTCTT	660
GACCCGTGCTG	GGCCAAGGTT	CTCCAGAAAA	CCACCATATA	GCAGATTAGA	TTACACGGAT	720
GCAAAGTTTG	TGGATGTCAT	CCATTCTGAC	TCCAATGGTT	TAGGCATTCA	AGAGCCCTTG	780
GGACATATAG	ATTTTTATCC	AAATGGAGGA	AATAACAAC	CTGGCTGTCC	TAAATCAATT	840
TTCTCAGGAA	TTCAATTCAT	TAAATGCAAC	CACCAGAGAG	CAGTTCACCT	GTTCATGGCA	900
TCTTTAGAAA	CAAACTGCAA	TTTTATTTCA	TTTCCTTGTC	GTTCATACAA	AGATTACAAG	960
ACTAGCTTAT	GTGTGGACTG	TGACTGTTTT	AAGGAAAAAT	CATGTCCTCG	GCTGGGTTAT	1020
CAAGCCAAGC	TATTTAAAGG	TGTTTTAAAA	GAAAGGATGG	AAGGAAGACC	TCTTAGGACC	1080
ACTGTGTTTT	TGGATACAAG	TGGTACATAT	CCATTCTGTA	CCTATTATTT	TGTTCTCAGT	1140
ATAATTGTTT	CAGATAAAAC	TATGATGGAT	GGCTCGTTTT	CATTTAAATT	ATTAAATCAG	1200
CTTGGAATGA	TTGAAGAGCC	AAGGCTTTAT	GAAAAGAACA	AACCATTTTA	TAAACTTCAA	1260
GAAGTCAAGA	TTCTTGCTCA	ATTTTATAAT	GACTTTGTAA	ATATTTCAAG	CATTGGTTTG	1320
ACATATTTCC	AGAGCTCAAA	TCTGCAGTGT	TCCACATGCA	CATACAAGAT	CCAGAGACTC	1380

ATGTTAAAT CACTTACATA CCCAGAAAGA CCACCACTTT GCAGGTATAA TATTGTACTT	1440
AAAGACAGAG AGGAAGTGT TCTTAATCCA AACACATGTA CACCAAAGAA CACATAAgat	1500
gccttcttcc atcaaatgca cttgcttggt aattaatgga cttgtaaatg aaacaatgca	1560
atcagtccttt tataatgcac tgttcaattt gagattcaag tatttctatt tcttgaaaa	1620
aattttaaga atcaaaaata aagaaaataa aaaatgcata cagttaaaca ttccaaa	1677

配列番号 4

SQ Sequence 1636 BP; 544 A; 286 C; 296 G; 510 T; 0 other;

ggtcttattt ATGTTGCTCA AATGTTTACA TAATAACTTG TGCCAAAAAT ATAGTGCTCA	60
TGCTTTTCAG TTCTACCCA GAAATGTCCT GTGGCTTCTA GTTGTGTGCC TGAGATCAGA	120
TAATAAAAGA CCATGCCTTG AATTCTCTCA GCTAAGTGT AAGGATTCCT TCAGAGATTT	180
ATTTATTCCG AGAATAGAGA CCATTCTGAT GATGTATACA AGGAACAACC TAAACTGTGC	240
TGAGCCACTG TTTGAACAAA ATAACCTACT TAATGTTAAT TTCAACACAC AAAAGAAAAC	300
AGTCTGGCTT ATTCACGGAT ACAGACCAGT AGGCTCCATC CCATTATGGC TTCAGAACTT	360
CGTAAGGATT TTGCTGAATG AAGAAGATAT GAATGTAATT GTAGTAGACT GGAGCCGGGG	420
TGCTACAAC TTTATTTATA ATAGAGCAGT TAAAAACACC AGAAAAGTTG CTGTGAGTTT	480
GAGTGTGCAC ATTAAAAATC TTTTGAAGCA TGGTGCATCT CTTGACAATT TTCATTTTAT	540
AGGTGTGAGT TTAGGGGCTC ATATCAGTGG ATTTGTTGGA AAGATATTTT ATGGTCAACT	600
TGGAAGAATA ACAGGTCTTG ACCCTGCTGG GCCAAGGTTT TCCAGAAAAC CACCATATAG	660
CAGATTAGAT TACACGGATG CAAAGTTTGT GGATGTCATC CATTCTGACT CCAATGGTTT	720
AGGCATTCAA GAGCCCTTGG GACATATAGA TTTTATCCA AATGGAGGAA ATAAACAACC	780
TGGCTGTCCT AAATCAATTT TCTCAGGAAT TCAATTCATT AAATGCAACC ACCAGAGAGC	840
AGTTCACCTG TTCATGGCAT CTTAGAAAAC AAAGTCAAT TTTATTTTAT TTCCTTGTCTG	900
TTCATACAAA GATTACAAGA CTAGCTTATG TGTGGACTGT GACTGTTTTA AGGAAAAATC	960
ATGTCCTCGG CTGGGTTATC AAGCCAAGCT ATTTAAAGGT GTTTTAAAAG AAAGGATGGA	1020
AGGAAGACCT CTTAGGACCA CTGTGTTTTT GGATACAAGT GGTACATATC CATTCTGTAC	1080
CTATTATTTT GTTCTCAGTA TAATTGTTCC AGATAAAACT ATGATGGATG GCTCGTTTTT	1140
ATTTAAATTA TTAAATCAGC TTGGAATGAT TGAAGAGCCA AGGCTTTATG AAAAGAACAA	1200
ACCATTTTAT AAAGTTCAAG AAGTCAAGAT TCTTGCTCAA TTTTATAATG ACTTTGTAAA	1260

TATTTCAAGC ATTGTTTGA CATATTCCA GAGCTCAAAT CTGCAGTGTT CCACATGCAC	1320
ATACAAGATC CAGAGACTCA TGTAAAAATC ACTTACATAC CCAGAAAGAC CACCACTTTG	1380
CAGGTATAAT ATTGTACTTA AAGACAGAGA GGAAGTGTTT CTTAATCCAA ACACATGTAC	1440
ACCAAAGAAC ACATAAagatg ccttcttcca tcaaatgcac ttgcttgtga attaatggac	1500
ttgtaaataa aacaatgcaa tcagtctttt ataatgcact gttcaatttg agattcaagt	1560
atttctatatt cttggaaaaa attttaagaa tcaaaaataa agaaaataaa aaatgcatac	1620
agttaaacaat tccaaa	1636

配列番号 5

ATTTTGTTCAAACAGTGGCTCAGCA

配列番号 6

TTCAAACAGTGGCTCAGCACAGTTT

配列番号 7

CGCGGATCCATGTTGCTCAAATGTTTACATAAT

配列番号 8

CGCGGATCCATGAGAGTATACATTTTCTTTGT

配列番号 9

AAATATGCGCCGCTTATGTGTTCTTTGGTGTACATGT

配列番号 10

AAAAACACCAGAAAAGTTGCTGTGAG

配列番号 11

GCTTGATAACCCAGCCGAGGACATG

1/1

PCT

PCT-AB01028

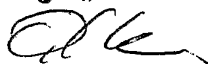
原本（出願用） - 印刷日時 2001年08月20日（20.08.2001）月曜日 09時34分56秒

0-1	様式-PCT/RO/134 (EASY) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.03.2001)
0-1-1		
0-2	国際出願番号.	PCT/JP01/07106
0-3	出願人又は代理人の書類記号	PCT-AB01028
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	24
1-2	行	1-4
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 1 中央第6
1-3-3	寄託の日付	2001年08月08日 (08.08.2001)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-7697
1-4	追加の表示	欧州特許 (EP) 指定国に関して、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許が拒絶され、取り下げられ、若しくは取り下げられたものとみなされる日まで、欧州特許条約施行規則第28条第3項にいう寄託された培養物の入手が請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ可能である (同施行規則第28条第4項) ようにすることを、出願人は請求する。
1-5	この表示を行うための指定国	
1-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	20.08.01
0-4-1	権限のある職員	國令 和夫

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	3 1.08.01
0-5-1	権限のある職員	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07106

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N 9/16, C12N 15/55, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/02, C12Q 1/68, A61K 31/711, A61K 38/46, A61K 39/395, A61P 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N 9/16, C12N 15/55, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/02, C12Q 1/68, A61K 31/711, A61K 38/46, A61K 39/395, A61P 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/57132 A1 (GENETICS INST.INC.), 11 November, 1999 (11.11.99), & AU 9940711 A & EP 1077991 A1	1-9, 11-12, 16, 19
X	JP 10-201479 A (Toray Industries, Inc.), 04 August, 1998 (04.08.98) (Family: none)	2-9, 11-12, 16, 19
X	WO 00/24911 A2 (INCYTE PHARM.INC.), 04 May, 2000 (04.05.00), & AU 200014516 A & EP 1131445 A1	2-9, 11-12, 16, 19
P, X	WO 01/32885 A2 (MILLENNIUM PHARM.INC.), 10 May, 2001 (10.05.01), & AU 200113616 A	2-9, 11-12, 16, 19
A	SATO, T. et al., Serine phospholipid-specific phospholipase A that is secreted from activated platelets. A new member of the lipase family. J.Biol.Chem. 1997, Vol.272, No.4, pp.2192-8	1-13, 16, 19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
08 November, 2001 (08.11.01)

Date of mailing of the international search report
20 November, 2001 (20.11.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07106

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HIGGS, H. N. et al., Cloning of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine testis. J.Biol.Chem. 1998, Vol.273, No.10, pp.5468-77	1-13, 16, 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07106

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17,18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 17 pertains to diagnostic methods to be practiced on the human body, while claim 18 pertains to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☒ Claims Nos.: 14,15
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Although the compound as set forth in claim 14 involves in its scope any compounds identified by the methods as set forth in claims 11 to 13, no particular compound is presented in the description as the above-described compound. Thus, it is recognized the above claim is not sufficiently supported by the description. The same applies to claim 15.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/07106

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 9/16, C12N 15/55, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/02, C12Q 1/68,
A61K 31/711, A61K 38/46, A61K 39/395, A61P 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 9/16, C12N 15/55, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 5/10, C07K 16/40, C12Q 1/02, C12Q 1/68,
A61K 31/711, A61K 38/46, A61K 39/395, A61P 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 99/57132 A1 (GENETICS INST. INC.) 11.11月.1999(11.11.99) & AU 9940711 A & EP 1077991 A1	1-9, 11-12, 16, 19
X	JP 10-201479 A (東レ株式会社) 4.8月.1998(04.08.98) (ファミリーなし)	2-9, 11-12, 16, 19
X	WO 00/24911 A2 (INCYTE PHARM. INC.) 4.5月.2000(04.05.00) & AU 200014516 A & EP 1131445 A1	2-9, 11-12, 16, 19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.11.01

国際調査報告の発送日

20.11.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 01/32885 A2 (MILLENNIUM PHARM. INC.) 10. 5月. 2001 (10. 05. 01) & AU 200113616 A	2-9, 11-12, 16, 19
A	SATO, T. et al. Serine phospholipid-specific phospholipase A that is secreted from activated platelets. A new member of the lipase family. J. Biol. Chem. 1997, Vol. 272, No. 4, p. 2192-8	1-13, 16, 19
A	HIGGS, H. N. et al. Cloning of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A ₁ from bovine testis. J. Biol. Chem. 1998, Vol. 273, No. 10, p. 5468-77	1-13, 16, 19

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17、18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲17は、人の身体の診断方法に関するものであり、請求の範囲18は、人の身体の治療方法に関するものである。

2. ☒ 請求の範囲 14、15 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

請求の範囲14に記載の化合物は、請求の範囲第11項ないし第13項に記載の方法で同定されるあらゆる化合物を包含するものであるが、明細書には、上記化合物として具体的なものが記載されておらず、明細書による十分な裏付けを欠いている。請求の範囲15も同様である。

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。